

# 胡桃의 활성산소 및 활성질소 제거 기전

정지천 · 배성민 · 신현철<sup>1\*</sup>

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 1:대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

## Scavenging Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by *Junglans sinensis*

Ji Cheon Jeong, Sung Min Bae, Hyeon Cheol Shin<sup>1\*</sup>

Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University,  
1: Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are widely implicated in the aging process and age-related diseases. The present study was carried out to investigate scavenging activities of *Junglans sinensis* extract and its subfraction using fluorescent probes, DCF-DA, DAF-2 and DHR 123. *Junglans sinensis* was washed and crushed. The crushed *Junglans sinensis* was extracted 3times, each time with 3 volumes of methyl alcohol at 60°C for 24 h. The extract was filtered and evaporated under a reduced pressure using a rotary evaporator to yield 16 g. Scavenging activities of ONOO<sup>-</sup> was measured by Kooy' method and ROS was measured by DCFDA assay. *Junglans sinensis* had the marked scavenging activites of ONOO<sup>-</sup>, NO and ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *Junglans sinensis* scavenged ONOO<sup>-</sup> through electron donation and dose-dependently inhibited the nitration of bovine serum albumin by ONOO<sup>-</sup>. *Junglans sinensis* also had ROS scavenging activity. Especially, ethylacetate fraction of *Junglans sinensis* showed the most effective scavenging activities for ROS and RNS. These results suggest that *Junglans sinensis* might be developed as an effective ROS and RNS scavenger. Therefore, *Junglans sinensis* might be used as a preventive agent for the aging and relevant to aging of illness.

Key words : *Junglans sinensis*, scavenging activities, reactive oxygen species, reactive nitrogen species

### 서 론

활성산소 (reactive oxygen species, ROS)는 일반적으로 superoxide anion radical (·O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical (·OH) 등의 산소종으로 내피의존성 이완 작용의 장애, 세포 증식, 혈관 염증 유발 및 리모델링 형성을 일으키고 고혈압, 동맥경화, 심부전 등 순환기계 질환의 발생에 깊이 관여한다<sup>1)</sup>. 넓은 뜻으로는 지질과산화물이나 할로겐화산소, 내피유래 이완인자로서 동정된 일산화질소 (NO)도 포함된다. 특히 최근 NO, NO<sub>2</sub>, HNO<sub>2</sub>, peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) 등의 질소화합물들을 총칭하여 활성질소 (reactive nitrogen species, RNS)라고 한다<sup>2)</sup>.

혈관벽에서 NO는 보통 NO synthase (NOS)에서 생산되어

내피유래 이완 작용, 혈소판 응집 억제, 혈관평활근 세포 증식 및 형질 변환의 조절에 중요한 역할을 맡고 있다. 최근에는 노화와 관련된 염증 상태에서의 세포 손상에 활성산소와 질소가 중요한 역할을 한다고 한다. NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있으며, 특히 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 ONOO<sup>-</sup>를 생성한다<sup>3)</sup>.

Yu<sup>4)</sup>는 NO, ONOO<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 등의 활성질소도 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH 등과 같은 활성산소와 함께 노화 과정에 기여할 뿐만 아니라, 여러 노인성 질환의 주범이라는 'Oxidative Stress Hypothesis'를 제안하였다.

ONOO<sup>-</sup>는 NO와 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 세포질 효소 활성의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 이러한 ONOO<sup>-</sup>의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다<sup>5-7)</sup>. 그러므로 ONOO<sup>-</sup>의 특성을 검토하고 연구하여 이것을 무독화시키

\* 교신저자 : 신현철, 경북 포항시 남구 대잠동 907-8, 대구한의대 포항한병원  
· E-mail : ungaeshin@naver.com, · Tel : 054-271-8003

· 접수 : 2005/09/09 · 수정 : 2005/12/05 · 채택 : 2005/12/14

는 방법은 노화과정뿐만 아니라 노인성 질환을 조절하는데 대단히 중요한 의미를 가진다. 인체 내에는 특이하게 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 효소가 밝혀져 있지 않으므로 한약재로부터 ONOO<sup>-</sup> 제거 활성을 탐색하는 것은 큰 의의가 있다.

胡桃 (Juglans sinensis)는 壯陽固精 通命門 制三焦 潤腸胃 溫肺定喘 補氣養血 등의 效能이 있어 腎虛腰痛, 陽痿, 遺精, 尿頻, 虛喘, 腎虛咳嗽 및 老人性 衰弱性 便秘 등의 治療에 活用되어 왔다<sup>8-11)</sup>. 또한 滋養強壯 補腦 抗衰老 작용도 있다고 하였으므로<sup>11,12)</sup> 補腎 효능과 함께 노화 방지 효능도 있을 것으로 보인다.

이전의 실험 연구에서胡桃는 항산화 효과를 나타내었으며<sup>13,14)</sup> 수은에 의한 간조직 손상을 방지하고<sup>15)</sup> glycerol에 의한 급성신부전을 방지하는<sup>16)</sup> 효과가 보고된 바 있다. 그러나 최근 노화 과정 및 여러 만성 질환에서 산화 스트레스의 주범으로 강력한 산화력을 가지는 ONOO<sup>-</sup>의 소거 작용에 관한 연구는 전혀 없다. 따라서 본 연구에서는胡桃의 활성산소 ( $\cdot O_2$ ) 및 활성질소 (NO, ONOO<sup>-</sup>) 소거 작용과 ONOO<sup>-</sup> 제거 기전, 알부민 nitration 억제능을 검토하였다. 또한胡桃의 활성 분획을 탐색하고, 강한 활성을 나타내는 분획의 ONOO<sup>-</sup> 및 활성산소 제거능을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

胡桃 (Juglans sinensis)를 市中에서 購入하여 精選하여 使用하였다.

#### 2) 시약

3-Morpholinopyridone (SIN-1), DL-penicillamine은 시그마 화학 주식회사 (St. Louis, MO, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 ONOO<sup>-</sup>은 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 조제

胡桃 (Juglans sinensis) 200 g을 잘게 분쇄하고 3배 량의 95% methanol을 가하여 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물 16g (수득률 8%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.胡桃의 활성 분획은 메탄올 추출물을 dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethylacetate (EtOAc), buthanol (BuOH) 및 물(H<sub>2</sub>O)로 재분획하여 증발 건조시켜 시료로 사용하였다.

#### 2) ONOO<sup>-</sup> 측정법

Kooy 등의 방법<sup>17)</sup>에 의해 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에胡桃추출물을 취하고, 90 nM NaCl, 5 mM

KCl 및 100 μM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)를 가한다. 그리고 10 μM ONOO<sup>-</sup> 첨가한 후, 형광 광도를 이용하여 excitation (500 nM)와 emission (536 nM)을 측정하였다.

#### 3) 활성산소 측정법

DCFDA assay<sup>18)</sup>로 활성산소를 측정하였다. 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20℃에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 μM DCFDA와 6 U/esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 22℃에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 되므로, excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 Fluorescence Microplate reader (FL 500, Bio-Tex instruments)로 측정하였다.

#### 4) NO 측정법

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. Dimethyl sulfoxide 550 μl에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석하였다. NO 제공 물질인 sodium nitroprusside (2 mM)와 DAF-2 (3.14 μM)를 96 well plate에 첨가하였다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 형광광도계 (FL500, Bio Tek사)를 이용하여 여기파장 485와 방출파장 530 nm에서 측정하였다<sup>19)</sup>.

#### 5) Protein nitration 측정

Bovine serum albumin (BSA, 0.5 mg) 95 μl에 농도별 시료나 혹은 용매 2.5 μl를 첨가하여 상온에서 10분간 shaking incubation한 후, ONOO<sup>-</sup> (4 mM in 0.3 N NaOH) 2.5 μl를 첨가하고 20분간 상온에서 incubation시켰다. Nitration 반응이 끝난 후, agarose gel에 전기영동하여 anti-nitrotyrosine antibody를 이용하여 protein이 nitration된 정도를 western blot으로 검토하였다.

#### 6) 3-Nitrotyrosine 측정

胡桃가 ONOO<sup>-</sup>에 의한 tyrosine의 nitration을 억제하는지의 여부는 이전에 기술했던 방법에 따라 측정하였다<sup>20)</sup>. 0.3 N NaOH에 녹아 있는 ONOO<sup>-</sup> (500 μM) 용액에胡桃추출물의 존재하에 100 μM tyrosine을 첨가하고 최종 부피를 1 ml로 맞춘다. Tyrosine과 ONOO<sup>-</sup>의 반응에 의한 3-nitrotyrosine의 형성도 측정하였다. 430 nm에서의 peak 스펙트럼은 3-nitrotyrosine의 생성을 의미한다.

#### 7) ONOO<sup>-</sup>의 제거 기전

胡桃의 작용 기전을 밝히기 위하여 ONOO<sup>-</sup>를 pannala 등의 방법<sup>21)</sup>에 따라 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 0.3 N NaOH에 녹아 있는 ONOO<sup>-</sup> (500 μM)에胡桃추출물을 50 mM

phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 첨가하고, 최종 부피가 1ℓ가 되도록 한다. 각 용액을 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 shaking incubation시킨 후, 분광광도계 (Ultraspec 2000 UV-visible spectrophotometer, Pharmacia- Biotech사)를 이용하여 190 nm와 600 nm 사이의 파장에서 검색한다. ONOO<sup>-</sup> 존재하에서胡桃 추출물에 의한 스펙트럼의 변화는 430 nm에서 측정하며, 이는 nitration 반응이 일어났음을 의미한다.

8) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

결 과

1. ONOO<sup>-</sup> 제거 활성

胡桃추출물을 2, 10, 50 μg/ml 처리할 경우 각각 45, 76, 96%의 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 나타내어 IC<sub>50</sub>=5.51 μg/ml의 강한 활성을 나타내었다 (Fig. 1). 이것은 positive control인 penicillamine과 거의 비슷한 활성을 나타내었다.

SIN-1에 의해 생성되는 ·O<sub>2</sub>와 NO의 상호 작용에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup>에 대하여胡桃추출물 2, 10, 50 μg/ml에서 각각 51, 85, 98%의 억제 활성 (IC<sub>50</sub>=2.02 μg/ml)을 나타내어, positive control인 penicillamine (1.58 μg/ml)과 비슷한 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

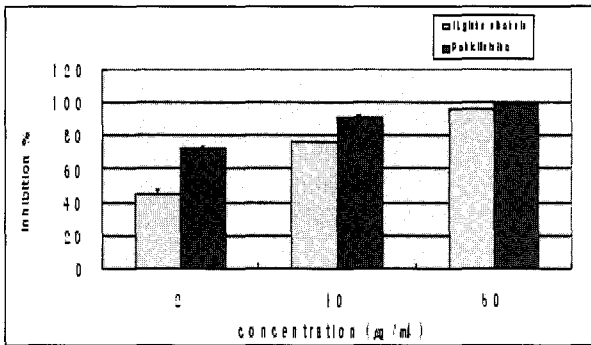


Fig. 1. ONOO<sup>-</sup> scavenging activity of *Juglans sinensis*. Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. ■ used as a positive control.

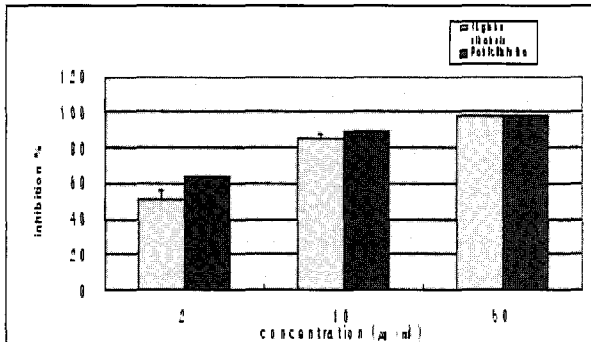


Fig. 2. Effect of *Juglans sinensis* on SIN-1-derived ONOO<sup>-</sup> generation. Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. ■ used as a positive control.

2. NO 제거 활성

胡桃추출물 2, 10, 50 μg/ml에서 각각 50, 68, 75%의 제거능을 나타내어 기존 NO의 제거제인 carboxy-PTIO 보다는 약하지만 매우 강한 NO 제거능을 나타내었다.胡桃는 ONOO<sup>-</sup> 뿐 아니라 NO도 제거함으로써 ONOO<sup>-</sup> 축적을 억제할 것으로 사료된다 (Fig. 3).

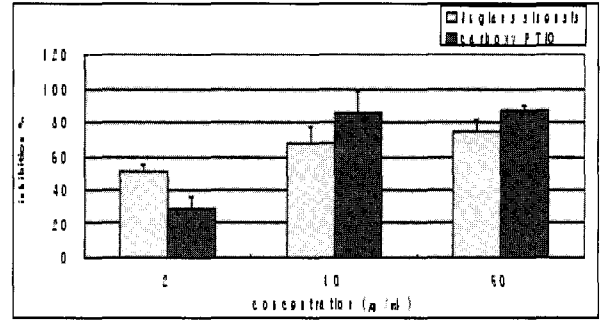


Fig. 3. Effect of *Juglans sinensis* on sodium nitroprusside-induced NO generation. Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. ■ used as a positive control.

3. ·O<sub>2</sub> 제거 활성

ONOO<sup>-</sup>의 다른 전구체인 ·O<sub>2</sub> 제거능을 검토한 결과, 2, 10, 50 μg/ml에서 각각 39, 79, 95%의 제거 활성을 나타내었다. 기존의 ·O<sub>2</sub> 제거제인 trolox보다는 약하지만, 비교적 강한 제거 활성을 나타내어胡桃가 ONOO<sup>-</sup> 및 NO뿐만 아니라, ·O<sub>2</sub>도 강력하게 제거함을 알 수 있었다 (Fig. 4).

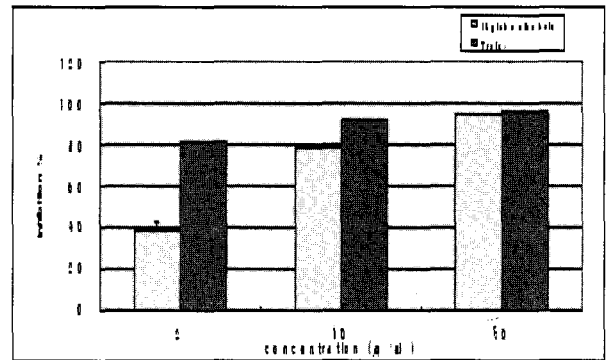


Fig. 4. Effect of *Juglans sinensis* on SIN-1-derived ·O<sub>2</sub> generation. Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. ■ used as a positive control.

4. 총활성산소 제거 활성

마우스의 homogenate에胡桃추출물을 처리한 후 30분간 총 활성산소 제거능을 검토한 결과, 2, 10, 50 μg/ml에서 각각 24, 36, 69%의 제거 활성을 나타내어胡桃추출물은 강력한 항산화력을 나타냄을 알 수 있었다 (Fig. 5).

5. ONOO<sup>-</sup> 제거 기전

胡桃가 어떠한 기전으로 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 가에 대해 검토하였다. Tyrosine은 ONOO<sup>-</sup>와 반응하며 430 nm에서 최대 흡광을 가지는 3-nitrotyrosine (Fig. 6B)을 생성한다.胡桃와 ONOO<sup>-</sup>

가 반응하여胡桃 성분이 nitration되어 nitro화물이 생성되는가를 검토한 결과, 430 nm에서 흡광도를 가지지 않으므로 (Fig. 6C, D, E)胡桃가 nitration되지 않고, electron donation에 의해 ONOO<sup>-</sup>를 제거할 가능성이 시사되었다. 그리고 Fig. 6A에서 보듯이 tyrosine 없이 ONOO<sup>-</sup>만 존재할 경우 430 nm에서 peak가 없으나, 거기에 tyrosine을 첨가할 경우 430 nm에서 peak가 나타나(Fig. 6B), Fig. 6F, G, H에서 보듯이胡桃를 각각 10, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가할 경우 농도 의존적으로 3-nitrotyrosine의 peak가 사라짐을 알 수 있다. 이것은胡桃가 매우 효과적으로 tyrosine의 nitration을 억제함을 알 수 있고, 이는 electron donation에 의해 제거함을 의미한다.

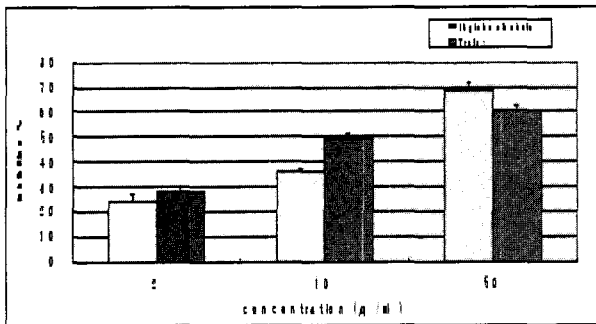


Fig. 5. Effect of *Juglans sinensis* on total reactive oxygen species generation. Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. ■, used as a positive control.

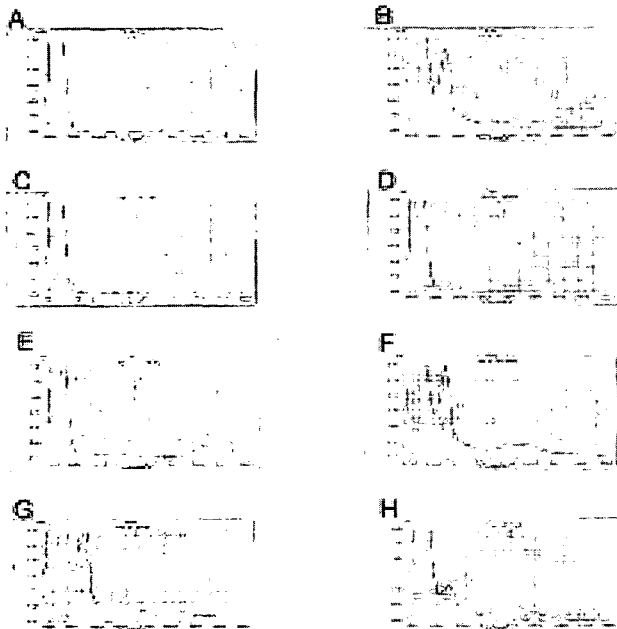


Fig. 6. Interaction of *Juglans sinensis* with ONOO<sup>-</sup> and its effect on ONOO<sup>-</sup>-mediated 3-nitrotyrosine. A : ONOO<sup>-</sup> (40  $\mu\text{M}$ ), B : Tyrosine(40  $\mu\text{M}$ ) with ONOO<sup>-</sup> (40  $\mu\text{M}$ ), C : *Juglans sinensis* (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with ONOO<sup>-</sup> (40  $\mu\text{M}$ ), D : *Juglans sinensis* (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with ONOO<sup>-</sup> (40  $\mu\text{M}$ ), E : *Juglans sinensis* (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with ONOO<sup>-</sup> (40  $\mu\text{M}$ ), F : Tyrosine (40  $\mu\text{M}$ ), *Juglans sinensis* (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with ONOO<sup>-</sup> (40  $\mu\text{M}$ ), G : Tyrosine (40  $\mu\text{M}$ ), *Juglans sinensis* (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with ONOO<sup>-</sup> (40  $\mu\text{M}$ ), H : Tyrosine (40  $\mu\text{M}$ ), *Juglans sinensis* (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with ONOO<sup>-</sup> (40  $\mu\text{M}$ ). Each mixed solution was incubated at 37°C with shaking for 1h and scanned between 190 and 600nm with spectrophotometric analysis. The spectrum of the peak displayed at 430nm reflects the formation of 3-nitrotyrosine.

### 6. albumin nitration 저해 효과

Albumin의 tyrosine이 ONOO<sup>-</sup>에 의해 nitration되는 정도에胡桃가 미치는 영향을 anti-nitrotyrosine 항체로 검토하였다. ONOO<sup>-</sup>에 의해 유도된 albumin nitration이胡桃추출물 10, 30, 90  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리에 의해 albumin의 tyrosine nitration을 농도 의존적으로 현저히 저해함을 알 수 있었다. 이것은胡桃가 electron donation에 의해 효과적으로 ONOO<sup>-</sup>를 제거함으로써 albumin의 nitration을 저해한 것으로 사료된다 (Fig. 7).

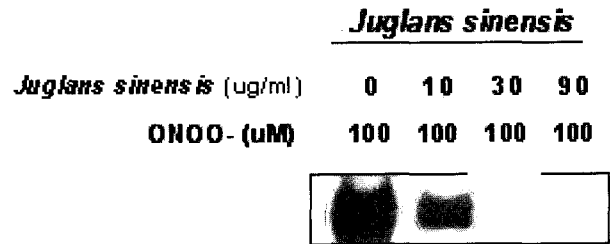


Fig. 7. Effect of *Juglans sinensis* on albumin nitration. *Juglans sinensis* was added to BSA. The reaction samples were incubated with shaking at 25°C for 1h. After ONOO<sup>-</sup> was added, all samples were further incubated with shaking at 25°C for 30 min.

### 7. ONOO<sup>-</sup> 제거 활성 분획 탐색

胡桃추출물을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, BuOH 및  $\text{H}_2\text{O}$  층으로 분획하여 각 분획별로 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 검토한 결과 MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$  층이 각각 90, 54, 95, 89, 76% 저해 활성을 나타내어 EtOAc 층이 가장 강한 활성을 나타내었다 (Table 1).

이들 각 분획의 총활성산소 생성에 미치는 영향을 검토한 결과, MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$  층이 각각 61, 8, 74, 59, 42%의 총활성산소 생성 억제 활성을 나타내어 총활성산소 제거능에 있어서도 EtOAc 분획이 강한 활성을 나타내어 활성 성분이 주로 EtOAc 분획에 이해되어 있을 가능성을 시사해 주었다 (Table 2).

Table 1. Effect of *Juglans sinensis* on Peroxynitrite Scavenging Activity

sample (f.c)	inhibition %
MeOH (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	90.02±1.19
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	53.54±1.99
EtOAc (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	95.14±0.36
BuOH (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	89.40±0.81
$\text{H}_2\text{O}$ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	75.52±0.48
Penicillaminea (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	65.97±1.94

Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. a, used as a positive control.

### 8. EtOAc 분획의 ONOO<sup>-</sup> 및 ROS 제거 활성

胡桃추출물의 EtOAc 분획은 2, 10 및 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 ONOO<sup>-</sup> 및 ROS를 농도 의존적으로 제거함을 알 수 있었다. 이것은胡桃의 EtOAc 성분 속에 존재하는 phenolic 물질들이 ONOO<sup>-</sup> 및

ROS 제거 활성을 나타낼 것으로 사료된다 (Fig. 8, 9)

Table 2. Effect of *Juglans sinensis* on Total ROS Scavenging Activity.

sample (f.c)	inhibition %
MeOH (10 ug/ml)	60.76±3.45
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ug/ml)	8.04±1.64
EtOAc (5 ug/ml)	74.27±1.56
BuOH (5 ug/ml)	59.32±0.88
H <sub>2</sub> O (5 ug/ml)	41.69±2.06
Troloxa (10 ug/ml)	39.93±5.16

Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. a, used as a positive control.

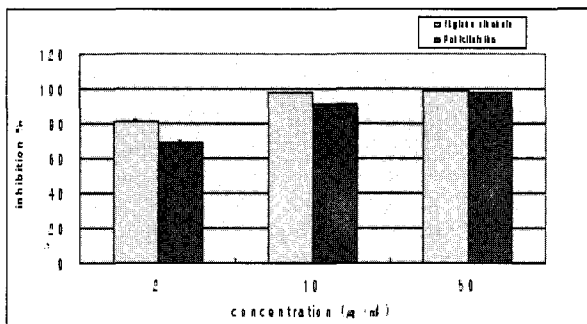


Fig. 8. Effect of *Juglans sinensis* EtOAc fraction on ONOO<sup>-</sup>. Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. ■ used as a positive control.

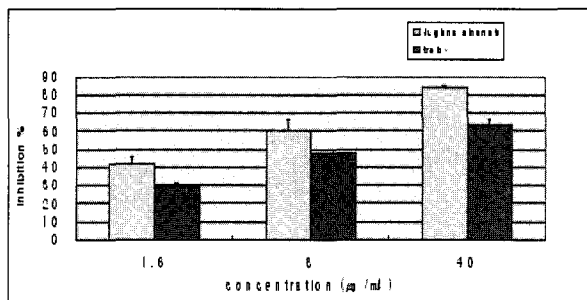


Fig. 9. Effect of *Juglans sinensis* EtOAc fraction on ROS scavenging activity. Each value is the mean±S.E. of triplicate measurements. ■ used as a positive control.

## 고찰

胡桃는 補腎 藥物로써 性味가 甘, 溫하고 腎, 肺에 歸經하며 壯陽固精 通命門 利三焦 潤腸胃 溫肺定喘 補氣養血 潤燥化痰 通潤血脈 潤肌 등의 效能이 있어 腎虛腰痛, 陽痿, 遺精, 尿頻, 虛喘, 腎虛咳嗽 및 老人性 衰弱性 便秘 등의 治療에 活用되어 왔다<sup>8-11)</sup>. 또한 滋養強壯 補腦 抗衰老 作用도 있어 延年益壽 藥물에 속하므로<sup>11,12)</sup> 老化 방지 효능도 있을 것으로 보인다. 內經 素問<sup>22)</sup>에 ‘天壽過度 氣脈常通 而腎氣有餘也’, 虞<sup>23)</sup>가 ‘腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭’라고 하여 長壽하는 것은 腎氣의 盛衰與否에 의하여 決定된다고 하였으니 腎氣虛衰는 老化의 重要 原因이다<sup>12)</sup>. 따라서 胡

桃가 노화 과정과 노인성 질환 및 여러 만성질환들과 밀접한 관계를 가지고 있는 활성산소와 NO 및 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 작용이 있는지를 검토하였다.

활성산소는 강력한 산화력을 나타내며 세포 구성 성분들을 변형시키는데 그 기전으로 -SH기의 산화, 지질과산화, DNA, 단백질의 니트로화 등을 들 수 있다. “Inflammation Hypothesis of Aging”에 의하면 노화 과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 COX-2, NADPH oxidase, XOD에 의한 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO<sup>-</sup> 생성을 더욱 증가시켜, 세포 및 조직 손상을 가져와 노화 과정을 촉진한다고 하였다<sup>24)</sup>.

염증, 감염뿐만 아니라 노인성 질환, 염증성 질환에서 ONOO<sup>-</sup>가 대량 생성되어 강한 조직 파괴력을 나타내며 여러 질병과 관련된다는 보고는 많다. ONOO<sup>-</sup>는 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다<sup>5,6,21)</sup>. 이와같이 ONOO<sup>-</sup>는 노화 과정뿐만 아니라 노인성 질환에 중요한 발병 요인으로 주목받고 있는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질이다.

胡桃의 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 능력을 ONOO<sup>-</sup>와 특이하게 반응하는 형광 probe를 내는 DHR 123을 이용하여 측정 한 결과,胡桃추출물은 ONOO<sup>-</sup> 자체를 강력히 제거할 뿐만 아니라, SIN-1에 의해 생성되는 ·O<sub>2</sub>와 NO에 의해 만들어지는 ONOO<sup>-</sup>에 대해서도 강력하게 제거하였다. ONOO<sup>-</sup>의 전구체인 ·O<sub>2</sub>와 NO의 제거능을 검토한 결과,胡桃는 ·O<sub>2</sub>와 NO를 모두 제거하는 활성을 나타내었다. 이는胡桃의 ONOO<sup>-</sup> 억제능에 ONOO<sup>-</sup>를 직접 제거하는 활성뿐만 아니라 ·O<sub>2</sub>와 NO를 각각 제거하는 능력도 가지고 있는 것으로 사료된다. 최근의 연구 보고에 의하면胡桃가 HgCl<sub>2</sub> 유도 급성신부전 모델 동물에서 항산화력을 나타내어 신장을 보호하는 작용이 있다고 보고하였다<sup>15)</sup>. 이는 본 연구의胡桃의 ·O<sub>2</sub> 제거능과 유사한 결과라고 사료된다.

胡桃 속에는 kaempferol-3-glucoside, α,β-hydrojugron, tannin, exelsin, lugron, linolein이 함유되어 있고<sup>25)</sup>, 서양胡桃 속에는 juglone, juglanin (kaempferol-arabinoside)이 함유되어 있다고 보고되어 있다<sup>25)</sup>. 실제로 많은 flavonoid들의 ONOO<sup>-</sup> 제거 활성에 대하여는 많은 연구보고가 있다<sup>26)</sup>.

Flavonoids는 과일, 채소류에 풍부히 존재하며 항산화 효과는 활성산소의 소거 작용, 전이금속과의 chelating 및 활성산소를 형성하는 효소를 저해하는 것으로 세분화할 수 있다. ONOO<sup>-</sup>에 대한 항산화 작용은 free aromatic hydroxyl group과 관련되는데 flavonol은 구조적으로 2개의 pharmacophore (ring B 즉 catechol의 OH group이 중요하고, ring A-C에서는 3-OH이 중요하다)를 가진다. Flavonols 중에서 EGCG, EC, GCG, EGC,

gallate ester (GE)는 chain-breaking antioxidant로서 작용하며 LDL의 산화를 방지하고 수용성, 지용성 radical을 소거할 뿐만 아니라 ONOO<sup>-</sup>에 의한 니트로화를 감소시키고 LDL의 surface charge alteration을 제한한다<sup>21)</sup>. 정 등은 polyphenol의 항산화능의 구조적인 특징을 밝혔으며, 녹차에서 추출한 EGCG 및 GCG가 직접 제거하는 기전으로 높은 활성을 나타내었다<sup>27)</sup>.

Flavonoids 중에서 quercetin이 강력한 항산화제로 작용하는데 이는 셀레늄을 함유한 단백질인 ebselen[2-phenyl-1,2-benzisoxazol-3-(2H)-one]과 비교해 볼 때 10배 정도 항산화 작용이 강하다고 보고하였다<sup>6)</sup>. Flavonoid의 ONOO<sup>-</sup> 소거 작용은 LDL 산화를 방지하고 심장질환의 발병률을 저하시키므로 flavonoid의 섭취가 심혈관계 질환 발병률과 역의 상관관계가 있음을 시사하였다<sup>28)</sup>. 丹參에서 추출된 caffeic acid는 높은 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 보였는데 BSA와 LDL이 ONOO<sup>-</sup>에서 니트로화되는 것을 막았으며, 枇杷에서 추출된 chlorogenic acid는 ONOO<sup>-</sup>를 직접 제거하는 작용을 나타내었다<sup>6)</sup>. Hydroxycinnamate는 채소, 과일 등에 존재하며, 대표적인 성분은 monohydroxamates인 ferulic acid와 coumaric acid가 있고 catecholates인 caffeic acid와 chlorogenic acids가 있다. 이들 모두는 ONOO<sup>-</sup>를 직접 제거하고 ONOO<sup>-</sup>에 의해 생성되는 nitrotyrosine 생성을 막았다. Monohydroxamates은 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 과정에서 자신이 직접 니트로화되며 catecholate는 수소 공여체로 작용한다고 알려져 있다<sup>24)</sup>. 이상에서 고찰한 바와 같이 대체로 천연물 성분들 중에 flavonoid들이나 phenolic 성분들이 강한 ONOO<sup>-</sup> 제거 활성 및 활성산소 제거능을 나타내는 것으로 사료된다.

활성산소, 질소 제거능을 나타내는 많은 성분들이 flavonoid와 phenolic tannin 물질이라는 것은 잘 알려져 있으며, 胡桃 속의 flavonoid인 kaempferol 유도체와 phenolic인 tannin이 ONOO<sup>-</sup> 제거 활성에 주된 역할을 하리라 생각된다.

그리고 胡桃의 ONOO<sup>-</sup> 제거 기전을 검토한 결과 ONOO<sup>-</sup> 제거시 electron donation에 의해서 ONOO<sup>-</sup>를 제거하리라 사료되었다. 또한 ONOO<sup>-</sup>에 의해 albumin 단백질의 tyrosine의 nitration 정도를 nitrotyrosine 함체로 검토한 결과, 胡桃추출물 처리에 의해 단백질 nitration이 현저히 억제됨을 알 수 있었다. 이는 胡桃추출물이 강력하게 ONOO<sup>-</sup>를 제거하여 세포 구성성분인 단백질을 보호해 줌을 알 수 있다.

胡桃의 활성분획을 검토하기 위하여 분획별 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 검색한 결과 EtOAc로부터 활성 성분의 연구가 기대되나, 이 분획으로부터 단리된 활성들은 앞에서 胡桃 성분으로는 언급된 kaempferol 유도체나 phenolic 유도체들이 주성분일 것으로 추측된다.

이상의 실험 결과로 보아 胡桃는 강력한 항산화력 즉, 활성산소와 활성질소 (NO, ONOO<sup>-</sup>)를 효과적으로 제거하여 활성산소·질소종이 관련된 노화과정 및 노인성 질환 예방 및 조절하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

## 결 론

노화 과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 활성산소

와 활성질소에 대한 胡桃의 제거능과 제거 기전을 검토하였다. 胡桃는 ONOO<sup>-</sup>를 농도 의존적으로 직접 제거하였으며, SIN-1에 의해 생성되는 ·O<sub>2</sub>와 NO의 상호작용에 의해 생성되는 ONOO<sup>-</sup>의 생성도 억제하였다. 胡桃는 SIN-1에 의해 생성되는 ·O<sub>2</sub>와 NO 생성제인 sodium nitroprusside에 의해 생성되는 NO도 효과적으로 제거하는 활성을 나타내었다. 胡桃는 신장 homogenate에 의해 생성되는 총활성산소도 효과적으로 제거하는 강력한 항산화력을 나타내었다. 胡桃는 electron donation에 의해 ONOO<sup>-</sup>를 제거하였고, ONOO<sup>-</sup>에 의한 tyrosine nitration을 농도 의존적으로 억제하였으며, albumin nitration도 농도 의존적으로 저해하였다. 胡桃추출물의 분획물들 중 EtOAc 분획이 강한 ONOO<sup>-</sup> 제거 활성을 나타내었고, 총활성산소종도 효율적으로 제거하는 작용을 나타내었다. 이러한 실험 결과는 胡桃가 electron donation에 의해 ONOO<sup>-</sup>, NO 및 ·O<sub>2</sub>를 매우 효과적으로 제거함으로써 노화 및 노화관련 질환의 조절약물로 개발될 가능성을 제시하였다.

## 참고문헌

1. Chung, H.Y. Aging and Carcinogenic Mechanisms Induced by Free Radicals. *Kor J Gerontol.*, 2, pp 1-11, 1992.
2. Chung, H.Y., Soung, D.Y., Kim, A.R., Choi, H.R., Kim, H.J., Choi, J.S., Yang, R., Lee, K.H., Yu, B.P. Generation, Toxicity and Scavenging of ONOO<sup>-</sup>: Its Involvement in the Aging Process. *Kor J Gerontol.*, 10, pp 46-59, 2000.
3. Carr, A.C. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, pp 1716-1723, 2000.
4. Yu, B.P. Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free Rad Biol Med.*, 21, pp 651-668, 1996.
5. Chung, H.Y., Soung, D.Y., Kim, A.R., Choi, H.R., Kim, H.J., Choi, J.S., Yang, R., Lee, K.H., Yu, B.P. Generation, Toxicity and Scavenging of ONOO<sup>-</sup> : Its Involvement in the Aging Process. *Kor J Gerontol.*, 10, pp 46-59, 2000.
6. Haenen, G.R., Paquay, J.B., Korthouwer, R.E., Bast, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.*, 236, pp 591-596, 1997.
7. Chung, H.Y., Kim, H.J., Jung, K.J., Yoon, J.S., Yoo, M.A., Kim, K.W., Yu, B.P. The inflammatory process in aging. *Reviews in Clinical Gerontology*, 10, pp 207-222, 2000.
8. 李尙仁. 本草學, 醫藥社, 서울, p 91, 1983.
9. 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, 上海, p 1544-1546, 1988.
10. 吳儀洛. 本草從, 上海科學技術出版社, 上海, p 203-204, 1982.
11. 楊永良 主編. 中醫食料學, 中國醫藥科技出版社, 北京, p 12, 1992.
12. 王其飛, 王瑞廷 編著. 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, 瀋陽, p 340-342, 1989.
13. 金永海, 金甲成. 胡桃藥液의 抗酸化效果에 관한 연구. 대한

- 한의학회지, 17, pp 9-20, 1996.
14. 강형정, 장경전, 송춘호, 안창범. 胡桃水鍼이 家兔 腎臟의 抗酸化 酵素 活性에 미치는 영향. 대한침구학회지, 15, pp 473-482, 1998.
  15. 이경태, 송춘호. 胡桃藥鍼液이 수은(Hg)에 의한 간조직 손상에 미치는 영향. 대한침구학회지, 16, pp 221-230, 1999.
  16. 이병훈, 서정철, 윤현민, 송춘호, 안창범, 장경전. 胡桃藥鍼이 Glycerol에 의한 급성신부전 유발시 뇨농축역능의 장애에 대한 영향. 대한침구학회지, 18, pp 114-122, 2001.
  17. Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H., Beckman, J.S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic Res Commun., 16, pp 149-56, 1994.
  18. Cathcart, R., Schwieters, E., Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. Anal Biochem., 134, pp 111-116, 1983.
  19. Nagata, N., Momose, K., Ishida, Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. J Biochem Tokyo, 125, pp 658-661, 1999.
  20. Park, H.J., Chung, H.Y., Kim, J., Choi, J.S. Antioxidant activity of 2,3,6-tribromo-4,5- dihydroxy benzyl methyl ether from Symphyocladia latiuscula. J Fish Sci Technol., 2, pp 1-7, 1999.
  21. Pannala, A.S., Rice-Evans, C., Halliwell, B., Singh, S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. Biochem Biophys Res Commun., 232, pp 164-170, 1997.
  22. 南京中醫學院 醫經教研組. 黃帝內經 素問 譯釋, 上海科學技術出版社, 上海, p 4-5, 1983.
  23. 虞 搏. 醫學正傳, 成輔社, 서울, p 9, 1986.
  24. Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, J.W. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. Ann N Y Acad Sci., 928, pp 327-335, 2001.
  25. 송주택, 정현배, 김병우, 진희성. 한국식물대보감(상권), 한국 자원식물연구소, 서울, pp 98-99, 1989.
  26. Choi, J.S., Chung, H.Y., Kang, S.S., Jung, M.J., Kim, J.W., No, J.K., Jung, H.A. The Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Scavengers of Peroxynitrite. Phytother Res., 16, pp 232-235, 2002.
  27. Chung, H.Y., Yokozawa, T., Soung, D.Y., Kye, I.S., No, J.K., Baek, B.S. Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. J Agric Food Chem., 46, pp 4484-4486, 1998.
  28. Neumann, H.A., Carlsson, K., Brom, G.H. Uptake and localization of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides in the venous wall measured by laser scanning microscopy. Eur J Clin Pharmacol., 43, pp 423-426, 1992.